## **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**



# Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

101 15 509.3

Anmeldetag:

29. März 2001

Anmelder/Inhaber:

Leica Microsystems Heidelberg GmbH.

68165 Mannheim/DE

Bezeichnung:

Anordnung zum Untersuchen mikroskopischer

Präparate mit einem Scanmikroskop und

Beleuchtungseinrichtung für ein Scanmikroskop

Priorität:

17. Juni 2000 DE 100 30 013.8

IPC:

G 02 B, G 02 F

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 14. Juni 2004

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

- erzon

# Anordnung zum Untersuchen mikroskopischer Präparate mit einem Scanmikroskop und Beleuchtungseinrichtung für ein Scanmikroskop

5

15

20

25

Die Erfindung betrifft eine Anordnung zum Untersuchen mikroskopischer Präparate mit einem Scanmikroskop. Im Besonderen betrifft die Erfindung eine Anordnung zum Untersuchen mikroskopischer Präparate mit einem Scanmikroskop, das einen Laser und ein optisches Mittel umfasst, das das von dem Laser erzeugte Licht auf eine zu untersuchende Probe abbildet. Das Scanmikroskop kann auch als konfokales Mikroskop ausgestaltet sein.

Des Weiteren betrifft die Erfindung eine Beleuchtungseinrichtung für ein Scanmikroskop.

In der Scanmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl abgerastert. Hierzu werden oft Laser als Lichtquelle eingesetzt. Aus der EP 0 495 930: "Konfokales Mikroskopsystem für Mehrfarbenfluoreszenz" ist beispielsweise ein Anordnung mit einem einzelnen, mehrere Laserlinien emittierenden Laser bekannt. Derzeit werden hierfür meist Mischgaslaser, insbesondere ArKr-Laser, eingesetzt.

Im Einsatz sind auch Diodenlaser und Festkörperlaser.

Aus der Patenschrift US-A-5,161,053 mit dem Titel "Confocal Microscope" ist ein konfokales Mikroskop bekannt, bei dem Licht einer externen Lichtquelle mit Hilfe einer Glasfaser zum Strahlengang des Mikroskops transportiert wird und das Ende der Glasfaser als Punktlichtquelle dient, so dass eine mechanische Blende überflüssig wird.

Das Emissionsspektrum von Lasern ist auf einen schmalen Wellenlängenbereich eingegrenzt, so dass zur simultanen Mehrlinienanregung das Licht mehrerer Laser zu einem Beleuchtungsstrahl vereinigt werden muss.

10

15

20

Die als Mehrlinienlaser meist eingesetzten Gaslaser sind sehr aufwendig und teuer. Darüber hinaus sind sie sehr wartungsbedürftig, was den Dauereinsatz bei vielen mikroskopischen Anwendungen erschwert.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Scanmikroskop zu schaffen, das die Probenuntersuchung mit mehreren spektralen Linien ermöglicht, ohne dabei auf den Einsatz vom Mehrlinienlaser angewiesen zu sein.

Die objektive Aufgabe wird gelöst durch eine Anordnung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass zwischen dem Laser und dem optischen Mittel ein optisches Bauelement vorgesehen ist, das das vom Laser erzeugte Licht bei einmaligem Durchlauf spektral verbreitert.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Beleuchtungseinrichtung für ein Scanmikroskop zu schaffen, die weitere spektrale Bereiche zugänglich macht, die bisher nicht adressierbar waren.

Die objektive Aufgabe wird gelöst durch eine Beleuchtungseinrichtung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass an der Lichtaustrittsöffnung ein optisches Bauelement angebracht ist, das aus photonic-band-gap-material besteht.

Das optische Bauelement in der Form eines "photonic-band-gap-material" hat den Vorteil, dass durch den optisch nichtlinearen Aufbau der Faser ein kurzer Laserimpuls verbreitert wird und somit ein spektral breites, kontinuierliches Lichtspektrum entsteht. Bei "Photonic-band-gap-material" handelt es sich um mikrostrukturiertes durchsichtiges Material. Meist durch Zusammenfügen von verschiedenen Dielektrika lässt sich dem resultierenden Kristall eine Bandstruktur für Photonen aufprägen, die an die elektronische Bandstruktur von Halbleitern erinnert.

Die Technik wird neuerdings auch bei Lichtleitfasern verwirklicht. Die Fasern werden durch Ausziehen von strukturiert angeordneten Glasrohren hergestellt. Den Fasern liegt eine besondere Struktur zugrunde: In Faserrichtung sind kleine Kanülen frei gelassen, die einen Abstand von etwa 2-3 μm und einen Durchmesser von ca. 1 μm haben und meist mit Luft gefüllt sind. In der Mitte der Faser liegt keine Kanüle vor. Diese Art von Fasern sind als "photon crystal fibres", "holey fibers" oder "microstructured fibers" bekannt.

10

15

20

"Photon crystal fibres" können für die Erzeugung einer kontinuierlichen spektralen Verteilung über den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich eingesetzt werden. Hierzu wird das Licht eines Kurzpulslasers in die Faser eingekoppelt. Durch den optisch nichtlinearen Aufbau der Faser verbreitert sich das Frequenzspektrum des Lasers. Es entsteht ein spektral breites, kontinuierliches Lichtspektrum.

Das optische Bauelement ist in einer bevorzugten Ausgestaltung des

Scanmikroskops aus einer Vielzahl von mikrooptischen Strukturelementen aufgebaut, die zumindest zwei unterschiedliche optische Dichten aufweisen. Ganz besonders bevorzugt ist eine Ausgestaltung, bei der das optische Element einen ersten Bereich und einen zweiten Bereich beinhaltet, wobei der erste Bereich eine homogene Struktur aufweist und in dem zweiten Bereich eine mikroskopische Struktur aus mikrooptischen Strukturelementen gebildet ist. Von Vorteil ist es außerdem, wenn der erste Bereich den zweiten Bereich umschließt. Die mikrooptischen Strukturelemente sind vorzugsweise Kanülen, Stege, Waben, Röhren oder Hohlräume.

Das optische Bauelement besteht in einer anderen Ausgestaltung aus nebeneinander angeordnetem Glas- oder Kunststoffmaterial und Hohlräumen. Besonders zu bevorzugen ist die Ausführungsvariante, bei der das optische Bauelement aus Photonic-Band-Gap-Material besteht und als Lichtleitfaser ausgestaltet, wobei vorzugsweise eine optische Diode vorgesehen ist, die eine Rückreflexion des Lichtstrahles unterdrückt des Lasers an den Enden der Lichtleitfaser

Eine ganz besonders bevorzugte und einfach zu realisierende
 Ausführungsvariante beinhaltet als optisches Bauelement eine herkömmliche Lichtleitfaser mit einem Faserkern, die zumindest entlang eines Teilstücks eine Verjüngung aufweist. Lichtleitfasern dieser Art sind als sog. "tapered fibers" bekannt. Vorzugsweise ist die Lichtleitfaser insgesamt 1 m lang und weist eine Verjüngung auf einer Länge von 30 mm bis 90 mm auf. Der
 Durchmesser der Faser beträgt in einer bevorzugten Ausgestaltung 150 μm außerhalb des Bereich der Verjüngung und der des Faserkerns in diesem Bereich ca. 8 μm. Im Bereich der Verjüngung ist der Durchmesser der Faser

10

15

20

25

auf ca. 2  $\mu m$  reduziert. Der Faserkern Durchmesser liegt entsprechend im Nanometerbereich.

Zum Einsatz in der Mikroskopie ist es wichtig, Mittel zur Wellenlängenauswahl und zur Lichtleistungsstabilisierung zu implementieren. Daher lässt sich in vorteilhafter Weise ein solcher Faserlaser mit akusto- oder elektrooptischen, einstellbaren Filtern (AOTF), mit akusto- oder elektrooptischen Deflektoren (AOD), akusto- oder elektrooptischen Strahlteilern (AOBS) kombinieren. Diese können zum einen zur Wellenlängenauswahl als auch zur Ausblendung des Detektionslichtes verwendet werden (unsere deutsche Anmeldung DE 199 06 757 A1: "Optische Anordnung").

Insbesondere in der konfokalen Mikroskopie läßt sich das Faseraustrittsende als Punktlichtquelle nutzen, wodurch die Verwendung einer Anregungsblende überflüssig wird. Bei einer solchen Ausgestaltung wäre es von besonderem Vorteil, das Faserende selbst teilreflektierend zu beschichten, so dass dieser Teilreflektor einen Resonatorendspiegel bildet.

In weiteren Ausführungsformen sind Vorrichtungen zur Kompensation von Lichtleistungsschwankungen vorgesehen. Beispielsweise kann eine Regelschleife zur Lichtleistungsstabilisierung eingebaut werden, die parasitär die Lichtleistung im Strahlengang des Mikroskops misst und beispielsweise durch Variation der Pumplichtleistung oder mit Hilfe eines akusto- oder elektrooptischen Elements die Probenbeleuchtungslichtleistung konstant hält. Zu diesem Zweck könnten auch LCD-Abschwächer verwendet werden.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist, wenn die Beleuchtungeeinrichtung bereits entsprechend gestaltet ist, dass sie mehrere spektrale Bereiche zur Beleuchtung liefert. Der Laser, der die Beleuchtungseinrichtung für ein Scanmikroskop darstellt, hat an der Lichtaustrittsöffnung ein optisches Bauelement befestigt. Das optische Bauelement besteht aus photonic-bandgap-material. Ferner kann das photonic-band-gap-material als Lichtleitfaser ausgestaltet sein.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben. Dabei zeigen:

	Fig. 1	eine erfindungsgemäße Anordnung mit einem Konfokalmikroskop,	
	Fig. 2	eine Anordnung, bei der auf ein Beleuchtungspinhole verzichtet wurde,	
5	Fig. 3	eine Anordnung mit Lichtleistungsstabilisierung,	
	Fig. 4	eine Ausführung des optischen Bauelements	
	Fig. 5	eine weitere Ausführung des optischen Bauelements.	
10	Fig. 1 zeigt ein Konfokalmikroskop, das ein optisches Bauelement 3 zur Aufweitung eines von einem Pulslaser 1 erzeugten Laserimpulses verwendet. Der Pulslaser 1 definiert einen gepulsten Laserstrahl 2, der durch das optische		
	band-gap-material breitbandiges Bele	itet wird. Das optische Bauelement 3 ist ein "photonic- Aus dem optischen Bauelement 3 tritt ein spektral uchtungslicht 4 aus, das von einer ersten Optik 5 auf ein ble 6 abgebildet wird und dann auf einen Strahlteiler 7 trifft.	
15	einer zweiten Optik einen Scanspiegel nachgeschaltet, die	gelangt das spektral breitbandige Beleuchtungslicht 4 zu k 8, die einen parallelen Lichtstrahl 4a erzeugt, der auf 9 trifft. Dem Scanspiegel 9 sind mehrere Optiken 10 und 11 e den Lichtstrahl 4a formen. Der Lichtstrahl 4a gelangt zu von dem er auf eine Probe 13 abgebildet wird. Das von der	
20	Probe reflektierte d Beobachtungsstral tritt abermals durch abgebildet, das voi	oder ausgesendete Licht definiert einen nlengang 4b. Das Licht des Beobachtungsstrahlengang 4b n die zweite Optik 8 und wird auf ein Detektionspinhole 14 r einem Detektor 15 sitzt. Durch das optische Bauelement 3 für die Untersuchung der Probe 13 notwendige Laserlicht	
25	•	gewünschten Spektrum zu erzeugen. estellte Ausführungsbeispiel zeigt ein Konfokalmikroskop,	
30	bei dem auf das Be mit den Elementen Bezugszeichen be:	eleuchtungspinhole 6 verzichtet wurde. Alle Elemente, die aus Fig. 1 übereinstimmen, sind mit dem gleichen zeichnet. Bei diesem Ausführungsbeispiel ist an Stelle der AOTF 16 (acousto optical tunable filter) eingesetzt, der mit	
30	·	den AOTF-Ansteuerung 17 verbunden ist. Da das optische	

10

15

20

25

30

Bauelement 3 ein breitbandiges Beleuchtungslicht 4 erzeugen kann, ist es notwendig, Mittel zur Wellenlängenauswahl und Lichtleistungsstabilisierung vorzusehen. In vorteilhafter Weise kann man akusto- oder elektrooptisch einstellbare Filter (AOTF) mit akusto- oder elektrooptischen Deflektoren (AOD) und akusto- oder elektrooptischen Strahlteilern (AOBS) kombinieren. Diese können zum einen zur Wellenlängenauswahl als auch zur Ausblendung des Detektionslichtes verwendet werden. Dem AOTF 16 ist ferner ein Strahlsumpf 18 zugeordnet, der die nicht verwendeten spektralen Anteile der Beleuchtungslicht fängt, um unnötige Störungen des Scanmikroskops zu vermeiden.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist in Fig. 3 dargestellt. Hier ist an Stelle des optischen Bauelements 3 eine Lichtleitfaser 20 verwendet, die aus dem photonic-band-gap-material besteht. Vom Pluslaser 1 wird der gepulste Laserstrahl 2 über eine Optik 19 in ein Eintrittsende 20a der Lichtleitfaser 20 eingekoppelt. Da die Lichtleitfaser 20 aus dem photonic-band-gap-material aufgebaut ist, tritt aus einem Austrittsende 20b ein spektral verbreiterter Laserimpuls aus, der über eine Optik 21 ausgekoppelt wird. Bevor der spektral verbreiterte Laserimpuls auf das Beleuchtungspinhole 6 trifft, wird eine spektrale Filterung vorgenommen. Dazu sind mehrere Farbfilter 24 auf einem Revolver 23 angeordnet. Über einen Motor 22 ist der Revolver 23 drehbar, so dass die entsprechenden Farbfilter 24 in den Strahlengang eingebracht werden können. Ebenso ist eine lineare Anordnung der Farbfilter 24 denkbar, dabei werden die Farbfilter 24 mittels einer Linearbewegung in einen Beleuchtungsstrahlengang 50 verfahren. Der Beleuchtungsstrahlengang 50 nach dem Beleuchtungspinhole 6 ist mit dem Strahlengang aus Fig. 1 vergleichbar. Wie bereits in Fig. 1 erwähnt, lenkt der Strahlteiler 7 das Licht auf den Scanspiegel 9. Ein Teil des Licht tritt durch den Strahlteiler 7 hindurch und definiert einen Verluststrahlengang 50a. Dieser Anteil des Lichts ist für die Beobachtung oder Messung verloren. Aus diesem Grunde ist im Verluststrahlengang 50a ein Detektor 25 vorgesehen, der das Verlustlicht bestimmt und daraus eine elektronische Größe ermittelt, die mittels einer Leitung 30 an eine Regelungselektronik 26 geleitet wird. Die Regelungselektronik 26 ist über eine weitere Leitung 32 mit dem Pulslaser 1

verbunden. Über die Leitung 32 regelt die Regelungselektronik 26 die Intensität des Pulslasers 1 in der Weise, dass an der Probe 13 immer eine konstante Lichtleistung auftrifft. Beispielsweise kann eine Regelschleife zur Lichtleistungsstabilisierung derart vorgesehen sein, dass sie parasitär die Lichtleistung im Strahlengang des Mikroskops misst und beispielsweise durch Variation der Pumplichtleistung oder mit Hilfe eines akusto- oder elektrooptischen Elements die Probenbeleuchtungslichtleistung konstant hält.

Fig. 4 zeigt schematisch eine Ausführung des optischen Bauelements 3. In dieser Ausführung besteht das optische Bauelement 3 aus einer herkömmlichen Lichtleitfaser 51 mit einem Außendurchmesser von 125 μm und einem Faserkern 52, der einen Durchmesser von 6 μm aufweist. Im bereich einer 300 mm langen Verjüngung 53 ist der Aussendruchmesser der Lichtleitfaser 51 auf 1,8 μm reduziert. In diesem Bereich beträgt der Durchmesser des Faserkerns 52 nur noch Bruchteile von Mikrometern.

Zu diesem Zweck könnten auch LCD-Abschwächer verwendet werden.

Fig. 5 zeigt eine Ausführung des optischen Bauelements 3. Dieses besteht aus Photonic-Band-Gap-Material, die eine besondere wabenförmige Mikrostruktur 54 aufweist. Die gezeigte Wabenstruktur ist für die Generierung von breitbandigem Licht besonders geeignet. Der Durchmesser der inneren Kanüle 55 beträgt ca. 1,9 μm. Die innere Kanüle 55 ist von Glassteegen 56 umgeben. Die Glasstege 56 formen wabenförmige Hohlräume 57. Diese mikrooptischen Strukturelemente bilden gemeinsam einen zweiten Bereich 58, der von einem ersten Bereich 59, der Glasmantel ausgeführt ist, umgeben ist.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform

25 beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und
Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich
der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.





20

## **Bezugszeichenliste**

	1	Pulslaser
	2	Gepulster Laserstrahl
5	3	optisches Bauelement
	4	Spektral breitbandiges Beleuchtungslicht
	4a	Lichtstrahl
	4b	Beobachtungsstrahlengang
	5	Optik
10	6	Beleuchtungspinhole
	7	Strahlteiler
	8	Optik
	9	Scanspiegel
	10	Optik
15	11	Optik
	12	Objektiv
	13	Probe
	14	Detektionspinhole
	15	Detektor
20	16	AOTF (acousto optical tunable filter)
	17	AOTF-Ansteuerung
	18	Strahlsumpf
	19	Optik
	20	photonic-band-gap-Lichtleitfaser
25	20a	Eintrittsende
	20b	Austrittsende
	21	Optik
	22	Motor
	23	Revolver
30	24	Farbfilter
	25	Detektor
	26	Regelungselektronik
	30	Leitung
	32	Leitung

	50	Beleuchtungsstrahlengang
	50a	Verluststrahlengang
	51	Lichtleitfaser
	52	Faserkern
5	53	Verjüngung
	54	Mikrostruktur
	55	Kanüle
	56	Glasstege
	57	Hohlräume
0	58	zweiter Bereich
	59	erster Bereich



### **Patentansprüche**

- 1. Anordnung zum Untersuchen mikroskopischer Präparate mit einem Scanmikroskop, das einen Laser (1) und ein optisches Mittel (12) umfasst, das das von dem Laser (1) erzeugte Licht auf eine zu untersuchende Probe (13) abbildet, **dadurch gekennzeichnet**, dass zwischen dem Laser (1) und dem optischen Mittel (12) ein optisches Bauelement (3, 20) vorgesehen ist, das das vom Laser (1) erzeugte Licht bei einmaligem Durchlauf spektral verbreitert.
- Scanmikroskop nach Anspruch 1, dadurch
   gekennzeichnet, dass das optische Bauelement (3, 20) aus photonic-bandgap-material besteht.
  - 3. Scanmikroskop nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass das photonic-band-gap-material als Lichtleitfaser (20)
    ausgestaltet ist.
- Scanmikroskop nach Anspruch 1, dadurch
   gekennzeichnet, dass das optische Bauelement (3, 20) als Lichtleitfaser (23)
   ausgeführt ist. die eine Verjüngung (53) aufweist.
  - 5. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Laser (1) ein Pulslaser ist.
- 20 6. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass dem optischen Bauelement (3, 20) Mittel (16, 18 und/oder 23, 24) zum Abschwächen und/oder Ausblenden des Lichtes mindestens einer Wellenlänge oder mindestens eines Wellenlängenbereichs nachgeordnet sind.
- 25 7. Scanmikroskop nach Anspruch 5, dadurch

30

**gekennzeichnet**, dass zum Abschwächen und/oder Ausblenden des Lichtes mindestens ein spektral selektiver Filter (24) vorgesehen ist.

- 8. Scanmikroskop nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Filter ein dichroitischer Filter (24) ist.
- 9. Scanmikroskop nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass zum Abschwächen und/oder Ausblenden des Lichtes ein akustooptischer Filter (16) (AOTF: acousto optical tunable filter) vorgesehen ist.
- Scanmikroskop nach Anspruch 6, dadurch
   gekennzeichnet, dass zum Abschwächen und/oder Ausblenden des Lichtes ein akustooptischer Deflektor (AOD: acousto optical deflector) vorgesehen ist.
  - 11. Scanmikroskop nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass zum Abschwächen und/oder Ausblenden des Lichtes ein LCD-Abschwächer vorgesehen ist.
- 15 12. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass Mittel (25, 26) zur Lichtleistungsstabilisierung vorgesehen sind.
  - 13. Scanmikroskop nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Lichtleistungsstabilisierung ein Regelkreis vorgesehen ist.
  - 14. Scanmikroskop nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Scanmikroskop ein Konfokalmikroskop ist.
- 15. Scanmikroskop nach Anspruch 14, dadurch
   25 gekennzeichnet, dass das Austrittsende (20b) der Lichtleitfaser (20) als Beleuchtungsblende dient.
  - 16. Beleuchtungseinrichtung für ein Scanmikroskop mit einem Laser (1), der eine Lichtaustrittsöffnung umfasst, **dadurch gekennzeichnet**, dass an der Lichtaustrittsöffnung ein optisches Bauelement (3, 20) angebracht ist, das aus photonic-band-gap-material besteht.

- 17. Beleuchtungseinrichtung nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass das photonic-band-gap-material als Lichtleitfaser (20) ausgestaltet ist.
- 18. Beleuchtungseinrichtung nach Anspruch 16, dadurch
   5 gekennzeichnet, dass das optisches Bauelement (3, 20) als Lichtleitfaser
   (20) ausgestaltet ist und eine Verjüngung aufweist.
  - 19. Beleuchtungseinrichtung nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Austrittsende (20b) der Lichtleitfaser (20) als Beleuchtungsblende dient.
- 10 20. Beleuchtungseinrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Laser (1) ein Pulslaser ist.

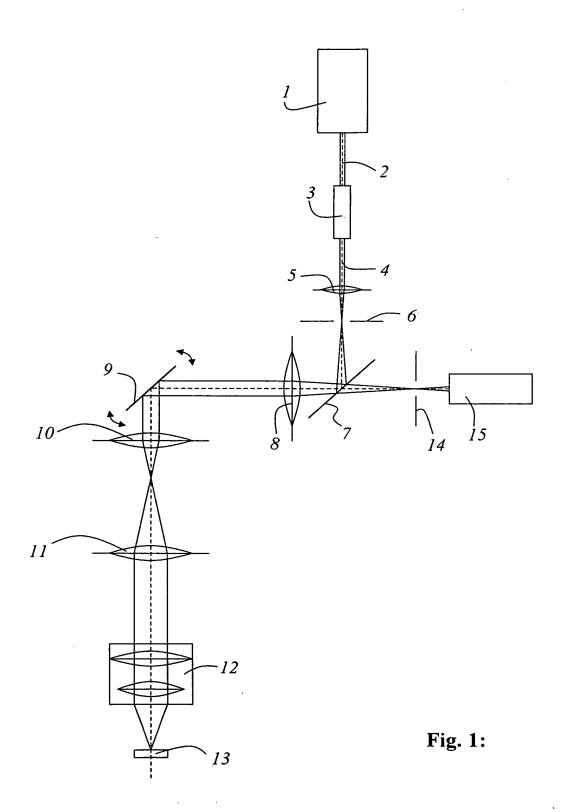
#### Zusammenfassung

Die Anordnung zum Untersuchen mikroskopischer Präparate mit einem Scanmikroskop besteht aus einem Laser (1) und einem optischen Mittel (12), das das von dem Laser (1) erzeugte Licht auf eine zu untersuchende Probe (13) abbildet. Zwischen dem Laser (1) und dem optischen Mittel (12) ist ein optisches Bauelement (3, 20) vorgesehen, das das vom Laser (1) erzeugte Licht bei einmaligem Durchlauf spektral verbreitert. Das optische Bauelement (3, 20) besteht aus photonic-band-gap-material. Besonders vorteilhaft ist es, wenn das photonic-band-gap-material als Lichtleitfaser (20) ausgestaltet ist.

10

5

Fig. 1



**,** 

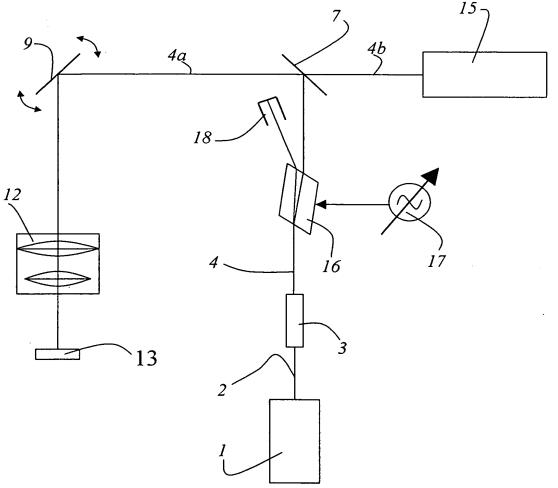


Fig. 2:

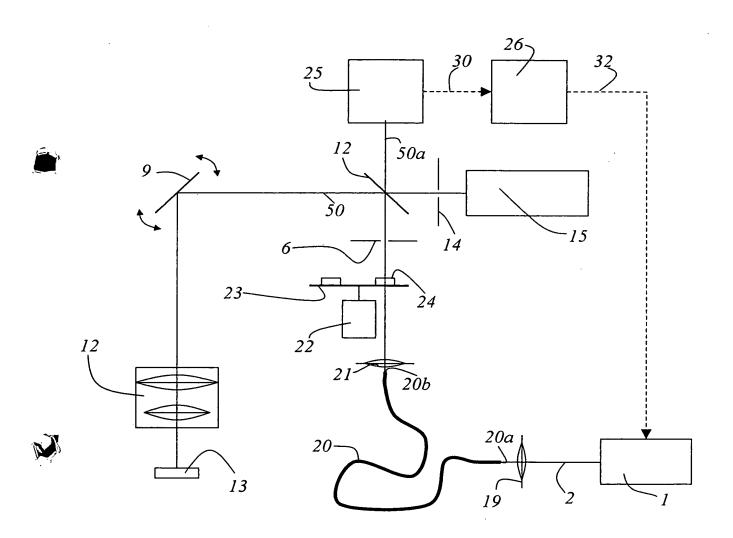


Fig. 3:

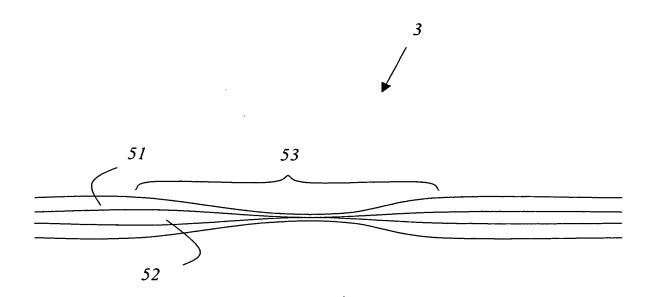


Fig. 4:

